

XP-002202045

AN - 1999-208101 [18]

AP - JP19970215164 19970808

CPY - TKEN

- KOKU-N

DC - D15 D16 E16 P43

DR - 0441-U

FS - CPI;GMPI

IC - B09C1/10 ; C02F3/00 ; C12N1/20

MC - D04-B07B D05-H04 D05-H08 E10-H04C3 E11-Q02

M3 - [01] H6 H602 H609 H682 H684 H7 H721 M280 M312 M321 M332 M343 M363 M391  
M416 M424 M750 M903 M904 M910 N131 N163 N164 N460 Q431 Q436 Q437 Q439;  
R00441-K R00441-X; 0441-U

PA - (TKEN ) TAKENAKA KOMUTEN KK

- (KOKU-N) ZH KOKUSAI KANKYO GIJUTSU ITEN KENKYU

PN - JP11046758 A 19990223 DW199918 C12N1/20 005pp

PR - JP19970215164 19970808

XA - C1999-060922

XIC - B09C-001/10 ; C02F-003/00 ; C12N-001/20 ; (C12N-001/20 C12R-001/38)

XP - N1999-153380

AB - J11046758 NOVELTY - Pseudomonas is cultured in a medium containing  
100-400 mg/l of toluene and sources of phosphorus, nitrogen, calcium,  
magnesium and iron. The culture medium is maintained at pH 5-9 and  
preculturing is performed at 10-40 deg. C.

- Preferably the sources of P, N, Ca, Mg and Fe are phosphate, nitrate,  
calcium, magnesium and iron ions respectively.

- USE - Pseudomonas is immobilised on a bioreactor to decompose  
trichloroethylene.

- ADVANTAGE - Pseudomonas with stable TCE decomposing ability is  
cultivated efficiently.

- (Dwg.0/1)

C - C12N1/20 C12R1/38

CN - R00441-K R00441-X

DRL - 0441-U

IW - CULTURE PSEUDOMONAS TRI CHLOROETHYLENE DECOMPOSE PERFORMANCE  
PREDETERMINED TEMPERATURE PH SPECIFIC CULTURE MEDIUM

IKW - CULTURE PSEUDOMONAS TRI CHLOROETHYLENE DECOMPOSE PERFORMANCE  
PREDETERMINED TEMPERATURE PH SPECIFIC CULTURE MEDIUM

NC - 001

OPD - 1997-08-08

ORD - 1999-02-23

PAW - (TKEN ) TAKENAKA KOMUTEN KK

- (KOKU-N) ZH KOKUSAI KANKYO GIJUTSU ITEN KENKYU

TI - Culture of Pseudomonas for tri:chloroethylene decomposition - is  
performed at predetermined temperature and pH using a specific culture  
medium

(19)日本国特許庁 (J P)

## (12) 公 開 特 許 公 報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開平11-46758

(43)公開日 平成11年(1999) 2月23日

(51)Int.Cl. <sup>6</sup>	識別記号	F I	
C 1 2 N 1/20		C 1 2 N 1/20	A
			F
	Z A B		Z A B D
B 0 9 C 1/10	Z A B	C 0 2 F 3/00	Z A B G
C 0 2 F 3/00	Z A B	B 0 9 B 3/00	Z A B E
審査請求 未請求 請求項の数 3 O L (全 5 頁) 最終頁に続く			

(21)出願番号	特願平9-215164	(71)出願人	000003621 株式会社竹中工務店 大阪府大阪市中央区本町4丁目1番13号
(22)出願日	平成9年(1997)8月8日	(71)出願人	591288355 財団法人国際環境技術移転研究センター 三重県四日市市桜町3690番地の1
		(72)発明者	廣瀬 朗 千葉県印西市大塚1丁目5番地1 株式会 社竹中工務店技術研究所内
		(72)発明者	大沢 武彦 千葉県印西市大塚1丁目5番地1 株式会 社竹中工務店技術研究所内
		(74)代理人	弁理士 中島 淳 (外4名) 最終頁に続く

(54)【発明の名称】 微生物菌体の培養方法

(57)【要約】

【課題】 安定したTCE分解能を有するシュードモナス (Pseudomonas) 菌類を効率よく培養しうる微生物菌体の培養方法を提供する。

【解決手段】 トリクロロエチレン分解能を有するシュードモナス (Pseudomonas) 菌類を培養する方法であって、シュードモナス (Pseudomonas) 菌類を、初期トルエン濃度100~400mg/lであって、少なくともリン源、窒素源、カルシウム、マグネシウム、鉄を含有し、pH5~9である培養液を用いて、10~40℃の温度範囲にて前培養を行うことを特徴とする。この前培養は、2~7回の回分培養を繰り返すことによって行なわれることが好ましい。

#### 【特許請求の範囲】

【請求項1】 トリクロロエチレン分解能を有するシュードモナス (*Pseudomonas*) 菌類を培養する方法であって、

該シュードモナス (*Pseudomonas*) 菌類を、初期トルエン濃度  $100 \sim 400 \text{ mg/l}$  であって、少なくともリン源、窒素源、カルシウム、マグネシウム、鉄を含有し、 $\text{pH} 5 \sim 9$  である培養液を用いて、 $10 \sim 40^\circ\text{C}$  の温度範囲にて前培養を行うことを特徴とする微生物菌体の培養方法。

【請求項2】 前記培養液に含まれるがリン源、窒素源、カルシウム、マグネシウム、鉄が、それぞれリン酸イオン、硝酸イオン、カルシウムイオン、マグネシウムイオン、鉄イオンであることを特徴とする請求項1に記載の微生物菌体の培養方法。

【請求項3】 前記前培養を、2～7回の回分培養を繰り返すことによって行うことを特徴とする請求項1又は2に記載の微生物菌体の培養方法。

#### 【発明の詳細な説明】

##### 【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、トリクロロエチレン分解能を有する微生物菌体の、効率のよい培養方法に関する。

##### 【0002】

【従来の技術】近年、土壤汚染、環境問題の解決策として、トリクロロエチレン（以下、適宜、TCEと称する）などの有機物質等の汚染物質を除去するための種々の試みがなされており、例えば、土壤中の汚染物質を真空ポンプを用いて吸引し、活性炭処理する方法が提案されている。しかしながら、汚染物質を活性炭で吸着して除去する方法では、汚染物質を吸着した使用済みの活性炭の再処理の問題もあって、より効率的な処理が求められていた。

【0003】一方、汚染物質を分解する微生物を含有するバイオリアクターによって汚染物質を分解させ、しかる後、液体成分と空気とを排出する方法も提案されており、この方法によれば、トリクロロエチレンの如き有機成分を効率よく抽出し、処理することができる。さらに汚染物質を微生物による分解作用を利用して処理するため2次汚染の問題がない。

【0004】ここに用いられる微生物菌体としては、シュードモナス (*Pseudomonas*) 菌類が知られている。シュードモナス (*Pseudomonas*) 菌類は好気性の菌体であり、トルエンを唯一の炭素源として利用し、増殖させることができる。しかしながら、通常の条件で培養しても得られたシュードモナス (*Pseudomonas*) 菌類のTCE分解能にばらつきが生じ、安定したTCE分解能が得られず、バイオリアクターの設計条件の確定を困難にしていた。

【0005】このシュードモナス (*Pseudomonas*) 菌類の一種である微生物菌体シュードモナス・セバシア (*Pseu*

*domonas cepacia*) をTCE分解に用いる方法は、例えば、特開平6-296711号に記載されている。ここでは、この菌体のTCE分解能を高める目的で、塩素化エチレン、芳香族化合物などの誘導物質を所定の条件で用いる旨の記載があるが、この条件は微生物菌体の増殖曲線から結果として導き出され、微生物の誘導時間を殆ど有しない条件を設定してあるため、それぞれの菌体に適する誘導物質の添加量はそれぞれの菌類と誘導物質の組み合わせによる予備培養によって決定しなければならず、好ましい培養条件を確定するのが困難であった。

##### 【0006】

【発明が解決しようとする課題】本発明の目的は、安定したTCE分解能を有するシュードモナス (*Pseudomonas*) 菌類を効率よく培養しうる微生物菌体の培養方法を提供することにある。

##### 【0007】

【課題を解決するための手段】本発明の微生物菌体の培養方法は、トリクロロエチレン分解能を有するシュードモナス (*Pseudomonas*) 菌類を培養する方法であって、該シュードモナス (*Pseudomonas*) 菌類を、初期トルエン濃度  $100 \sim 400 \text{ mg/l}$  であり、少なくともリン源、窒素源、カルシウム、マグネシウム、鉄を含有し、 $\text{pH} 5 \sim 9$  である培養液を用いて、 $10 \sim 40^\circ\text{C}$  の温度範囲にて前培養することを特徴とする。ここで、前記培養液に含まれるリン源、窒素源、カルシウム、マグネシウム、鉄は、それぞれリン酸イオン、硝酸イオン、カルシウムイオン、マグネシウムイオン、鉄イオンであることが好ましい。また、この前培養は、2～6回の回分培養を繰り返すことによって行われることが好ましい。この培養方法によれば、誘導物質（炭素源）であるトルエンの初期濃度を一定の好ましい範囲とし、所定の培養必須成分を好ましくはイオンの状態で添加した培養液によって前培養することにより、ある程度（2～6時間）の誘導時間を経た後、対数的に増殖を続け、安定したTCE分解能を有するシュードモナス (*Pseudomonas*) 菌類を選択的に得ることができる。このため、その後、大量培養を行うにあたっての、所望のTCE分解能を有するシュードモナス (*Pseudomonas*) 菌類の接種源を安定して得ることができる。

##### 【0008】

【発明の実施の形態】この培養方法を適用しうるトリクロロエチレン等の有機塩化物の分解に有用なシュードモナス (*Pseudomonas*) 菌類としては、例えば、シュードモナスエスピー (*Pseudomonas sp.*)、シュードモナス・プチダ (*Pseudomonas putida*)、シュードモナス・セバシア (*Pseudomonas cepacia*) 等が挙げられる。

【0009】このシュードモナス (*Pseudomonas*) 菌類は、培養液中に炭素源であるトルエンを初期濃度  $100 \sim 400 \text{ mg/l}$  となる量添加して前培養を行う。初期トルエン濃度が  $100 \text{ mg/l}$  未満であると菌体の増殖

性が不充分であり、400mg/l期を超える菌体の増殖性が徐々に低下し、且つ、得られる菌体のTCE分解能が低下するため、いずれも好ましくない。菌体の増殖性と得られるTCE分解能を考慮すると、初期トルエン濃度は200~300mg/lの範囲であることが好ましい。

【0010】また、TCE分解能を有するシュードモナス (*Pseudomonas*) 菌類を得るには、前記培養液に少なくともリン源、窒素源、カルシウム、マグネシウム、鉄等の成分を含有し、且つ、培養液のpHは5~9の範囲であることが必要である。これらの必須成分であるリン源、

#### 無機塩組成

$(\text{NH}_4)_2 \text{SO}_4$   
 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$   
 $\text{KH}_2\text{PO}_4$   
 $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$   
 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$   
 $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$

【0012】また、培養条件のpHは5~9の範囲であり、特に7.0~8.0の中性~弱アルカリ性範囲であることが好ましい。培養液のpHは、リン酸塩の組成によって調整することができる。

【0013】なお、この培養方法においては、前記条件で前培養を行うことにより、その後の大量培養の接種源となる安定したTCE分解能を有する微生物菌体を簡易に得ることができる。この前培養は本格的な大量培養を行う前に少なくとも1回行われるが、得られる菌体のTCE分解能の向上と特性の安定化の観点から、回分培養にて2~7回繰り返されることが好ましく、4~6回繰り返されることがさらに好ましい。また、回分培養の場合、対数増殖後期(トルエン消費が終了した時点)で採取した菌種を基に次の段階の培養を行うことが好ましい。本発明の方法によれば、安定したTCE分解能を有する菌体を大量に培養し得るため、効率のよいバイオリアクターの構築が可能となった。

#### 【0014】

【実施例】以下、本発明を具体例を挙げて詳しく説明するが、本発明はこれに制限されるものではない。

【0015】(実施例1~4)本発明の微生物菌体の培養方法について詳細に説明する。ここで培養に用いるのはシュードモナスエスピー (*Pseudomonas* sp.)である。このシュードモナスエスピーは、例えば、特公昭63-7752号や特公平5-88106号に記載のシュードモナス属に属する菌体であつてもよい。培養液として以下に示すものを用いた。

イオン交換水	1000ml
硫酸アンモニウム	2.5g
硫酸マグネシウム	0.2g
リン酸1カリウム	1.4g
リン酸2ナトリウム	3.6g

窒素源、カルシウム、マグネシウム、鉄は、それぞれリン酸イオン、硝酸イオン、カルシウムイオン、マグネシウムイオン、鉄イオンのようなイオンの状態で培養液に含まれることが効果の観点から好ましい。従って、この培養液には、イオンに解離し易い硝酸、硫酸、リン酸のカルシウム塩、マグネシウム塩、鉄塩などの化合物を添加することが好ましい。これらの各必須成分を添加した好ましい培養液の代表例を以下に挙げる。この無機塩組成の類似範囲であれば好適に使用し得る。

#### 【0011】

2.5	g/リットル
0.2	g/リットル
1.4	g/リットル
3.6	g/リットル
2	mg/リットル
10	mg/リットル

#### 硫酸第一鉄

2mg

#### 塩化カルシウム

10mg

これらの混合物にトルエンを初期濃度100mg/lとなるように加えたものを培養液として用いた。培養条件としては、培養温度20℃、培養pH7.5で培養を行った。

【0016】この時の経時的なトルエン濃度の変化及び菌数の変化(光学濃度による)を図1にグラフで示した。また、トルエンの初期濃度を200mg/l、300mg/l、400mg/lとした他は前記と同様にして培養を行い、トルエン濃度の変化及び菌数の変化を同じく図1に示した。図1に明らかなように、菌数は200~400秒程度の誘導時間を経た後、順調に増加することがわかった。

【0017】(実施例5)トルエンを初期濃度123mg/lとなるように加えた培養液を用い、培養温度25℃、培養pH8.0とした他は実施例1と同様にして培養を行った。得られた菌体のTCE分解能を測定したところ、TCE最大比分解速度で1.24(mg/l/hr/OD660)であり、バイオリアクター用の菌体として実用可能なレベルに達していることがわかった。

【0018】(実施例6)トルエンを初期濃度130mg/lとなるように加えた培養液を用い、培養温度25℃、培養pH7.8とした他は実施例1と同様の条件で回分培養を2回繰り返して行った。得られた菌体のTCE分解能を測定したところ、TCE最大比分解速度で1.84(mg/l/hr/OD660)であり、バイオリアクター用の菌体として実用可能なレベルに達していることがわかった。

【0019】(実施例7)トルエンを初期濃度64mg/lとなるように加えた培養液を用い、培養温度25℃、培養pH7.7とした他は実施例1と同様の条件で回

分培養を3回繰り返して行った。得られた菌体のTCE分解能を測定したところ、TCE最大比分解速度で1.94 (mg/l/hr/OD660)であり、バイオリクター用の菌体として実用可能なレベルに達していることがわかった。

【0020】(実施例8)トルエンを初期濃度82mg/lとなるように加えた培養液を用い、培養温度25℃、培養pH8.0とした他は実施例1と同様の条件で回分培養を4回繰り返して行った。得られた菌体のTCE分解能を測定したところ、TCE最大比分解速度で2.76 (mg/l/hr/OD660)であり、バイオリクター用の菌体として実用可能なレベルに達していることがわかった。

【0021】(実施例9)トルエンを初期濃度68mg/lとなるように加えた培養液を用い、培養温度25℃、培養pH7.8とした他は実施例1と同様の条件で回分培養を5回繰り返して行った。得られた菌体のTCE分解能を測定したところ、TCE最大比分解速度で2.69 (mg/l/hr/OD660)であり、バイオリクター用の菌体として実用可能なレベルに達していることがわかった。

【0022】(実施例10)トルエンを初期濃度125mg/lとなるように加えた培養液を用い、培養温度25℃、培養pH8.0とした他は実施例1と同様の条件で回分培養を6回繰り返して行った。得られた菌体のTCE分解能を測定したところ、TCE最大比分解速度で2.07 (mg/l/hr/OD660)であり、バイオリクター用の菌体として実用可能なレベルに達していることがわかった。

【0023】(実施例11)トルエンを初期濃度61mg/lとなるように加えた培養液を用い、培養温度25℃、培養pH7.7とした他は実施例1と同様の条件で回分培養を7回繰り返して行った。得られた菌体のTCE分解能を測定したところ、TCE最大比分解速度で1.86 (mg/l/hr/OD660)であり、バイオリクター用の菌体として実用可能なレベルに達している

ことがわかった。

【0024】前記実施例5～11の対比において、前培養を1回行うよりも複数回繰り返すことにより、よりTCE分解能の高い菌体を得られる傾向が見られ、特に、回分培養4～6回において、好ましいTCE分解能を有するシュードモナスエスピーが得られることがわかった。このようにして培養されたシュードモナスエスピーは、TCE分解能が高く、これを接種源とすることにより、高いTCE分解能を有する菌体の大量培養が可能となる。また、大量培養されたシュードモナスエスピーをバイオリクターに固定化して、トリクロエチレン等の有害物質の分解に用いることができる。

【0025】バイオリクターに用いられる固定化材料は微生物によって好適なものを選択しうるが、例えば、ピートモス、ポリウレタン樹脂の如き有機多孔質体等を用いることができる。汚染物質を抽出した気液との接触面積を向上させるため、固定化材料はフィルター等の多孔性構造を有することが好ましい。固定化材料に固定化された微生物によるバイオリクターは、1段として用いてもよいが、処理効率上、バイオリクターは多段を形成することが好ましい。

【0026】かくして培養されたシュードモナス (*Pseudomonas*) 菌類によって、トリクロエチレンを分解除去すれば、活性炭等従来の物理的吸着による除去のごとく、吸着体自体の処理が問題になることがなく処理に伴う2次汚染の問題もない。

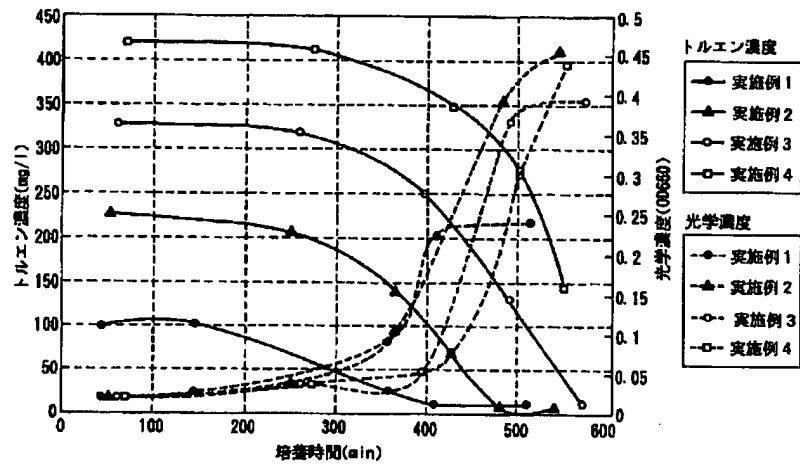
【0027】

【発明の効果】本発明の微生物菌体の培養方法によれば、安定したTCE分解能を有するシュードモナス (*Pseudomonas*) 菌類の培養を効率よく行うことができる優れた効果を示す。

【図面の簡単な説明】

【図1】シュードモナス菌類をトルエンを炭素源として培養した場合の時間と、トルエン濃度、細菌濃度との関連を示すグラフである。

【図1】



フロントページの続き

(51) Int. Cl. <sup>6</sup>

識別記号

F I

//(C 1 2 N 1/20

C 1 2 R 1:38)

(72) 発明者 北川 正恭

三重県四日市市桜町3690-1 財団法人国

際環境技術移転研究センター内